

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/003813

International filing date: 28 February 2005 (28.02.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2004-057618  
Filing date: 02 March 2004 (02.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 14 April 2005 (14.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

28.02.2005

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日            2 0 0 4 年   3 月   2 日  
Date of Application:

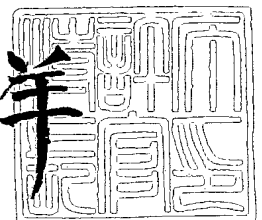
出 願 番 号            特 願 2 0 0 4 - 0 5 7 6 1 8  
Application Number:  
[ST. 10/C]:            [ J P 2 0 0 4 - 0 5 7 6 1 8 ]

出   願   人            独 立 行 政 法 人 海 洋 研 究 開 発 機 構  
Applicant(s):

2 0 0 5 年   3 月 3 1 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川 洋



出証番号   出証特 2 0 0 5 - 3 0 2 8 5 5 3

【書類名】 特許願  
【整理番号】 03P066  
【提出日】 平成16年 3月 2日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【国際特許分類】 C12N 1/00  
【発明者】  
    【住所又は居所】 神奈川県横須賀市夏島町 2 - 1 5 海洋科学技術センター内  
    【氏名】 出口 茂  
【発明者】  
    【住所又は居所】 神奈川県横須賀市夏島町 2 - 1 5 海洋科学技術センター内  
    【氏名】 津留 美紀子  
【発明者】  
    【住所又は居所】 神奈川県横須賀市夏島町 2 - 1 5 海洋科学技術センター内  
    【氏名】 伊藤 進  
【発明者】  
    【住所又は居所】 神奈川県横須賀市夏島町 2 - 1 5 海洋科学技術センター内  
    【氏名】 掘越 弘毅  
【特許出願人】  
    【識別番号】 000124982  
    【氏名又は名称】 海洋科学技術センター  
【代理人】  
    【識別番号】 100077975  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 望月 孜郎  
【代理人】  
    【識別番号】 100086324  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 小野 信夫  
【手数料の表示】  
    【予納台帳番号】 153867  
    【納付金額】 21,000円  
【提出物件の目録】  
    【物件名】 特許請求の範囲 1  
    【物件名】 明細書 1  
    【物件名】 図面 1  
    【物件名】 要約書 1  
    【包括委任状番号】 0303675  
    【包括委任状番号】 0303676

**【書類名】特許請求の範囲****【請求項 1】**

培地固化成分としてセルロースゲルを含む固体培地。

**【請求項 2】**

セルロースゲルの結晶化度が 5～70%であることを特徴とする、請求項 1 記載の固体培地。

**【請求項 3】**

用いるセルロースの分子量が 10,000～2,000,000であることを特徴とする、請求項 1 または 2 に記載の固体培地。

**【請求項 4】**

セルロースゲルが、セルロースを骨格部分とし、セルロース濃度が 0.01%以上である多孔質のセルロースゲル構造体であることを特徴とする、請求項 1 ないし 3 のいずれかに記載の固体培地。

**【請求項 5】**

セルロースゲルが、空隙率が 50%以上の多孔質ゲル状構造体であることを特徴とする、請求項 1 ないし 4 のいずれかに記載の固体培地。

**【請求項 6】**

セルロースゲルが、セルロースをチオシアン酸塩水溶液中で加熱・溶解し、次いで冷却・固化して得られるゲル状材料であることを特徴とする、請求項 1 ないし 5 のいずれかに記載の固体培地。

**【請求項 7】**

溶媒に分散したセルロースを、機械的混合及び／又は加熱によって溶解又は膨潤させ、次いで冷却及び／又は溶媒の除去により固化させた後、これに栄養素成分を浸透させることを特徴とする、セルロースゲル固体培地の製造方法。

**【請求項 8】**

溶媒に分散したセルロースを加熱することにより溶解し、次いで冷却して固化させ、溶媒成分を除去した後、栄養素成分を浸透させることを特徴とする、請求項 7 記載のセルロースゲル固体培地の製造方法。

**【請求項 9】**

溶媒がチオシアン酸のアルカリ金属塩またはアルカリ土類金属塩の水溶液であることを特徴とする、請求項 7 又は 8 に記載のセルロースゲル固体培地の製造方法。

**【請求項 10】**

溶媒がチオシアン酸カルシウムの水溶液であることを特徴とする、請求項 7 ないし 9 のいずれかに記載のセルロースゲル固体培地の製造方法。

**【請求項 11】**

溶媒がチオシアン酸カルシウムの飽和水溶液で、加熱温度が 70～200℃であることを特徴とする、請求項 7 ないし 10 のいずれかに記載のセルロースゲル固体培地の製造方法。

**【請求項 12】**

培地固化成分としてセルロースゲルを用いた固体培地の表面で微生物または細胞を培養することを特徴とする、微生物または細胞の培養方法。

**【請求項 13】**

セルロースゲルを用いた固体培地で培養する微生物が極限環境微生物であることを特徴とする、請求項 12 に記載の微生物の培養方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】セルロース固体培地とその製造方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、微生物等の培養に用いる固体培地とその製造方法に関し、特に培地固化成分としてセルロースゲルを用いた固体培地とその製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

微生物の培養方法としては、液体培地による方法と固体培地による方法がある。液体培地を用いる方法では、菌の生育が脆弱であったり、変異株が取得できない、或いは純度の低い菌しか単離することができないなどといった問題があった。一方、固体培地を用いる方法は、このような問題が少なく、明瞭に分離したコロニーが形成されるため、微生物の単離とその純粋培養方法として古くから使用されている。この固体培地の固化成分としてはコッホの時代にさかのぼる古くから、寒天ゲルが使用されている。寒天ゲルは、細菌の生育する広い温度範囲で硬く透明な固体であり、寒天を分解できる微生物はごく限られたものしかなく、液化が問題となることがほとんどないなどの優れた性質を有するため、培地固化剤として非常に優れたものであり、現在までこれに代わる優れた培地固化剤は見出されていないと言っても過言ではない(非特許文献1参照)。

【0003】

しかしながら、このような寒天ゲルも温度、pH或いは塩濃度などの条件によっては、軟化したり溶解してしまうため、培地固化成分として使用できる範囲には一定の制限があった。時に、近年になり、新たな有用微生物を探索するために、より広い範囲の温度、pH、塩濃度などの培養条件下での微生物の培養が必要となり、このようなより広い範囲の培養条件下で使用可能な培地固化成分の開発が望まれている。例えば、今までに121℃という高温で生育可能な超好熱菌が見つかり、このような超好熱菌の産生する酵素は、工業的に有用であると考えられるが、そのような微生物が増殖する温度は、寒天の軟化温度以上であるため固体培養ができず、もっぱら液体培養によって生産されている。しかし、液体培養では、既に述べたように、生育が脆弱であり、変異株が取得できない、単離された菌の純度が低いなど、固体培養と比べて著しい制限を受けることとなる。

【0004】

従って、より幅広い培養条件下でも使用可能な培地固化成分を開発する試みが種々なされており、例えばジェランガムを培地固化成分として使う方法(例えば、非特許文献2参照)、培地を含有したシリカゲルプレート上で培養を行う方法(例えば、非特許文献1参照)などがある。しかしながら、ジェランガムを用いる方法では、培地中のカチオン(金属性陽イオン)が不足すると固まらない、或いは酸性度が増すと固まりにくくなる等の問題がある。また、シリカゲルプレートを使う方法では、アルカリ条件下での使用が困難であり、かつ保水性が悪く、プレート表面が乾燥しやすく、微生物の生育に悪影響を与えという問題がある。つまり、幅広い温度、pH、塩濃度などの培養条件下で十分に満足して利用可能な固体培地は依然として未開発であると言わざるを得ない。

【0005】

【非特許文献1】新生化学実験講座17、日本生化学会編、15-20頁、1992年、東京化学同人社発行、

【非特許文献2】Shungu, D., Valiant, M., Tutlane, V., Weniberg, E., Weissberger, B., Koupal, L., Gadebusch, H., and Stapley, E., "Appl. Environ. Microbial.", 1983, 46, 840-845.

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明は、以上のような、温度、pH或いは塩濃度などの条件によっては使用することができない寒天培地などの従来の固体培地の問題点を解決し、より広い範囲の培養条件下

で使用することができる固体培地とその製造方法を提供することを目的とするものである。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らは、以上のような従来の固体培地の問題点を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、培地固化成分としてセルロースゲルを用いることによってこれらの課題を解決できることを見出し本発明を完成した。

【0008】

即ち、本発明は、以下の内容をその要旨とするものである。

(1) 培地固化成分としてセルロースゲルを含む固体培地。

(2) セルロースゲルの結晶化度が5～70%であることを特徴とする、前記(1)記載の固体培地。

(3) 用いるセルロースの分子量が10,000～2,000,000であることを特徴とする、前記(1)または(2)に記載の固体培地。

(4) セルロースゲルが、セルロースを骨格部分とし、セルロース濃度が0.01%以上である多孔質のセルロースゲル構造体であることを特徴とする、前記(1)ないし(3)のいずれかに記載の固体培地。

(5) セルロースゲルが、空隙率が50%以上の多孔質ゲル状構造体であることを特徴とする、前記(1)ないし(4)のいずれかに記載の固体培地。

(6) セルロースゲルが、セルロースをチオシアン酸塩水溶液中で加熱・溶解し、次いで冷却して得られる多孔質のゲル状材料であることを特徴とする、前記(1)ないし(5)のいずれかに記載の固体培地。

(7) 溶媒に分散したセルロースを、機械的混合及び／又は加熱によって溶解又は膨潤させ、次いで冷却及び／又は溶媒の除去により固化させた後、これに栄養素成分を浸透させることを特徴とする、セルロースゲル固体培地の製造方法。

(8) 溶媒に分散したセルロースを加熱することにより溶解し、次いで冷却して固化させ、溶媒成分を除去した後、栄養素成分を浸透させることを特徴とする、前記(7)に記載のセルロースゲル固体培地の製造方法。

(9) 溶媒がチオシアン酸のアルカリ金属塩またはアルカリ土類金属塩の水溶液であることを特徴とする、前記(7)または(8)に記載のセルロースゲル固体培地の製造方法。

(10) 溶媒がチオシアン酸カルシウムの水溶液であることを特徴とする、前記(7)ないし(9)のいずれかに記載のセルロースゲル固体培地の製造方法。

(11) 溶媒がチオシアン酸カルシウムの飽和水溶液で、加熱温度が70～200℃であることを特徴とする、前記(7)ないし(10)のいずれかに記載のセルロースゲル固体培地の製造方法。

(12) 培地固化成分としてセルロースゲルを用いた固体培地の表面で微生物または細胞を培養することを特徴とする、微生物または細胞の培養方法。

(13) セルロースゲルを用いた固体培地で培養する微生物が極限環境微生物であることを特徴とする、前記(12)に記載の微生物の培養方法。

【発明の効果】

【0009】

本発明の培地固化成分としてセルロースゲルを用いた固体培地は、高い温度や広いpH範囲、或いは広い塩濃度の範囲で安定な諸性質と形状を保持して、良好な固体培地が得られ、広範囲の培養条件下で軟化したり溶解することがなく使用することができる固体培地である。したがって、従来の代表的な固体培地である寒天を用いた固体培地では不可能であった、100℃を超える高い温度や、pHが3以下或いは10以上という厳しい条件でも微生物等の培養が可能となる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0010】

本発明で使用するセルロースゲルを得るためのセルロースは、植物あるいは微生物によ

って生産されるグルコースが $\beta$ -1-4グルコシド結合を介して直鎖状に結合した多糖類またはその種々の誘導体である。本発明のセルロースゲルのためのセルロース誘導体としては、分岐を持つものや、硝酸エステル、リン酸エステル、キサントゲン酸塩、亜硝酸エステル、硝酸エステル、硫酸エステル、ギ酸エステル、酢酸エステル、プロピオン酸エステル、酪酸エステル、吉草酸エステル、酢酸プロピオン酸エステル、酢酸酪酸エステル、トリフルオロ酢酸エステル、安息香酸エステル、トシルエステル、フェニルカルバニレート、アルキルケテンダイマーエステル、アルケニル無水コハク酸エステル等のエステル化誘導体；カルボキチメチルセルロース、メチルセルロース、エチルセルロース、プロピルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、メチルヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、メチルヒドロキシプロピルセルロース、エチルヒドロキシエチルセルロース、シアノエチルセルロース、ジエチルアミノエチルセルロース、トリメチルアンモノイルヒドロキシプロピルセルロース、トリフェニルメチルセルロース等のエーテル化誘導体；フッ素、塩素、臭素、ヨウ素などを導入したハロゲン化誘導体；アミノ基を導入した誘導体、チオール基を導入した誘導体、高分子をグラフトした誘導体、ポリウロン酸型の酸化物誘導体等のセルロース誘導体であってもよい。またセルロースゲルを得た後に、化学修飾を施したものでよい。これらのセルロースまたはその誘導体は、その分子量が10,000~2,000,000のものが好ましく、特に、分子量が10,000~100,000の $\alpha$ -セルロースが望ましい。

#### 【0011】

本発明で使用するセルロースゲルは、上記のようなセルロースまたはその誘導体を、溶媒に溶解または膨潤させ、次いで再結晶化または固化させることによって得ることができる。

セルロース類の溶媒への溶解はセルロース分子の大きさ、セルロース分子中の水酸基やピラノース環の酸素原子の作用等が複雑に影響する。本発明で使用するセルロースゲルは、溶媒中にセルロース類を分散・混合し、必要に応じて加熱して溶解または膨潤させ、その後、必要に応じて冷却して固化させ、溶媒を除去して得ることができる。

#### 【0012】

このセルロースまたはその誘導体を溶解する溶媒としては、塩酸、硫酸、硝酸、リン酸等の無機酸水溶液；水酸化リチウム、水酸化ナトリウムなどのアルカリ溶液；塩化亜鉛、チオシアン酸塩、液体アンモニア／チオシアン酸塩、液体アンモニア／ナトリウム、液体アンモニア／ヨウ化アンモニウム、ヒドラジン等の無機化合物の水溶液； $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4](\text{OH})$ 、 $[\text{Cu}(\text{エチレンジアミン})_2](\text{OH})_2$ 、 $[\text{Co}(\text{エチレンジアミン})_2](\text{OH})_2$ 、 $[\text{Ni}(\text{NH}_3)_2](\text{OH})_2$ 、 $[\text{Ni}(\text{エチレンジアミン})_3](\text{OH})_2$ 、 $[\text{Cd}(\text{エチレンジアミン})_3](\text{OH})_2$ 、 $[\text{Zn}(\text{エチレンジアミン})_3](\text{OH})_2$ 、 $\text{Fe}$ ：酒石酸： $\text{NaOH}$ 等の金属錯体溶液；ジメチルスルホキシド／ホルムアルデヒド、 $\text{N}$ ， $\text{N}$ -ジメチルホルムアミド／ホルムアルデヒド、 $\text{N}$ ， $\text{N}$ -ジメチルアセトアミド／ホルムアルデヒド、ジメチルスルホキシド／クロラル、 $\text{N}$ ， $\text{N}$ -ジメチルホルムアミド／クロラル、 $\text{N}$ ， $\text{N}$ -ジメチルアセトアミド／クロラル、ジメチルスルホキシド／クロラル／ピリジン、 $\text{N}$ ， $\text{N}$ -ジメチルホルムアミド／クロラル／ピリジン、 $\text{N}$ ， $\text{N}$ -ジメチルアセトアミド／クロラル／ピリジン、ジメチルスルホキシド／クロラル／トリエチルアミン、 $\text{N}$ ， $\text{N}$ -ジメチルホルムアミド／クロラル／トリエチルアミン、 $\text{N}$ ， $\text{N}$ -ジメチルアセトアミド／クロラル／トリエチルアミン、ジメチルスルホキシド／無水亜硫酸／ジエチルアミン、 $\text{N}$ ， $\text{N}$ -ジメチルホルムアミド／無水亜硫酸／ジエチルアミン、ジメチルスルホキシド／無水亜硫酸／トリエチルアミン、 $\text{N}$ ， $\text{N}$ -ジメチルホルムアミド／無水亜硫酸／トリエチルアミン、ジメチルスルホキシド／無水亜硫酸／ピペリジン、 $\text{N}$ ， $\text{N}$ -ジメチルホルムアミド／無水亜硫酸／ピペリジン、ジメチルスルホキシド／無水亜硫酸／イソアミルアミン、 $\text{N}$ ， $\text{N}$ -ジメチルホルムアミド／無水亜硫酸／イソアミルアミン、ジメチルスルホキシド／ $\text{N}_2\text{O}_4$ 、 $\text{N}$ ， $\text{N}$ -ジメチルホルムアミド／ $\text{N}_2\text{O}_4$ 、ジメチルスルホキシド／ $\text{NOC1}$ 、 $\text{N}$ ， $\text{N}$ -ジメチルホルムアミド／ $\text{NOC1}$ 、ジメチルスルホキシド／ $\text{NOSO}_4\text{H}$ 、 $\text{N}$ ， $\text{N}$ -ジメチルホルムアミド／ $\text{NOS}$

O<sub>4</sub>H、N、N-ジメチルアセトアミド/塩化リチウム、N-メチル-2-ピロリドン/塩化リチウム、1, 3-ジメチル-2-イミダゾリジノン/塩化リチウム、N、N-ジメチルアセトアミド/臭化リチウム、N-メチル-2-ピロリドン/臭化リチウム、1, 3-ジメチル-2-イミダゾリジノン/臭化リチウム、トリフルオロ酢酸、トリフルオロ酢酸/クロロホルム、トリフルオロ酢酸、トリフルオロ酢酸/酢酸、N-メチルモルフォリン-N-オキシド含水塩、N-メチルモルフォリン-N-オキシド含水塩/ジメチルスルホキシド、N-アルキルピリジウムハロゲン類等の有機溶媒から選ばれる1種又は2種以上の混合物などを使用することができる。

#### 【0013】

これらの中でも、チオシアン酸塩水溶液を溶媒として使用すると、セルロースを膨潤させてセルロースの結晶面の面間隔を増大させ、さらに加熱することによって溶解し、次いでこれを冷却すると固化してゲル状となり、本発明の固体培地に適した多孔質のゲル状構造体を形成するので、溶媒としてより好ましいものである。このようなチオシアン酸塩としては、チオシアン酸ナトリウム、チオシアン酸カリウム等のチオシアン酸アルカリ金属塩、及びチオシアン酸カルシウム、チオシアン酸マグネシウム等のチオシアン酸アルカリ土類金属塩が好ましい。特に、チオシアン酸カルシウムを質量濃度で40%以上含むチオシアン酸カルシウム水溶液、またはチオシアン酸ナトリウムを質量濃度で50%以上含むチオシアン酸ナトリウム水溶液が好ましく、チオシアン酸カルシウムの飽和水溶液が最も望ましい。

また、ここで使う水としては、超純水、蒸留水、脱イオン水など精製水が使用されるが、水道水であってもよい。

#### 【0014】

セルロース溶解用の溶媒中へのセルロースの添加量は特に制限されないが、溶解するセルロースの分子量等によってその量を調整する。一般的に、溶媒に対して0.01質量%以上、好ましくは0.01~20質量%程度にするのが、操作の容易さの点で望ましい。溶媒中への分散方法は、特に制限はなく通常行なわれる種々の方法で溶媒中に分散すればよく、セルロースを溶媒に添加した後、単に攪拌する程度でもよい。本発明のセルロースゲルを得るには、セルロースを溶媒中に分散・混合して、必要に応じてさらに加熱して、セルロースを膨潤させ、更に溶解させる。次いで、膨潤し、溶解したセルロース溶液を、必要に応じて冷却して、固化させ、溶媒を除去して、本発明に使用するに適した多孔質のセルロースゲルを形成させる。この際、セルロースは、溶媒に対してその溶解度以上の量を添加してもよい。この場合は、加熱後であってもセルロースの一部が溶解しない状態のまま冷却固化されることとなるが、このようにして得られたセルロースゲルも多孔質のゲル状を示し、本発明の固体培地に好適に使用することができる。

#### 【0015】

溶媒としてチオシアン酸塩を使用する場合には、セルロースは溶媒中で70℃以上に加熱してセルロースを膨潤させ溶解させることが好ましく、更には80~200℃に加熱して溶解することがより好ましい。加熱手段は特に制限されないが、通常はオートクレーブやマイクロ波を使用して加熱するのが製造効率の面で望ましい。例えば、セルロースとして市販の微結晶セルロースを、溶媒としてチオシアン酸カルシウムの飽和水溶液を使用した場合、95℃では約1分間の加熱でセルロースを溶解することができる。

#### 【0016】

次に、ゲル化したセルロースゲルから、セルロースの溶媒成分を洗浄して除去する。この溶媒がチオシアン酸塩の場合には、セルロースゲルの洗浄に用いる洗浄溶媒は、チオシアン酸塩を溶解するものであればよく、水や極性有機溶媒が挙げられる。このような洗浄溶媒としては、例えば、水、メタノール、エタノール、アセトンの群から選ばれる1種または2種以上の混合物を用いるのが望ましい。ここで使う水は超純水、蒸留水、脱イオン水等精製水が使用されるが、水道水でもよい。洗浄方法は、特に制限されないが、流水中に浸漬したり、洗浄水を入れた容器中に浸漬し、洗浄水を適宜交換する方法などによって行なう。洗浄に際して電気透析を使用することが洗浄効率の面から望ましい。また、セル



ローソグルの洗浄度は、洗浄液の電気伝導度を測定することによって確認することができる。

#### 【0017】

得られるセルロースグルの結晶化度は5～70%であり、特に30～50%であるのが望ましい。また、セルロースグルに用いるセルロースの分子量は10,000～2,000,000であり、10,000～100,000のものが好ましい。

このようにして得られたセルロースグルは、図1および図2に示すようにセルロースを骨格部分とし、ゲル中のセルロース濃度が0.01%以上の非常に大きい空隙を有する多孔質のセルロースゲル構造体である。このような多孔質のセルロースゲル構造体の空隙率は50%以上であり、更には空隙率が80～99.99%のものをを用いることがより好ましい。このようなセルロースゲルに様々な栄養素成分を含んだ培地を接触させると、この培地が固体のセルロースゲルの内部の空隙部分に効率よく浸透して栄養素成分を取り込み、固体培地を形成することができる。

#### 【0018】

本発明のセルロースゲル固体培地は、従来の寒天培地に用いられる種々の培地がそのまま使用することができる。例えば、天然培地としては、肉汁、ペプトン、酵母エキス、麦芽エキス、血清などの天然物を主成分として含む天然培地や、市販の合成培地等を使用することができる。これらの培地を前記セルロースゲルに接触させることによって、これらの栄養素を含んだセルロースゲル固体培地とすることができる。

#### 【0019】

本発明のセルロースゲル固体培地は、その形状は特に制限されず、平板、斜面、高層培地などとして用いることができる。

#### 【0020】

得られた本発明のセルロースゲル固体培地は、低い温度からかなり高温まで、また広いpH範囲にわたってその性質が安定しており、高い温度に加熱しても軟化したり溶解することがなく、安定してその形状を保持し、かつ保水性も良好で乾燥しにくく、優れた固体培地として使用することができる。具体的には-20℃から250℃の温度範囲で使用することが可能であるが、0℃～150℃の温度範囲での使用が好ましい。また、本発明のセルロースゲル固体培地は、pHが1～14という広い範囲で安定して使用することができるが、pHが2～12の範囲での使用が好ましい。さらに、本発明のセルロースゲル固体培地は、浸透させる培地の塩濃度には影響されず安定にその形状を保持しながら、任意の濃度の塩類を吸収して培地として使用することができる。

#### 【0021】

かくして製造されたセルロースゲルを用いた本発明の固体培地は、温度やpHについて幅広い培養条件下で使用可能であり、多くの種類の微生物や細胞の培養などの用途に幅広く使用することができる。

この本発明のセルロースゲルを用いた固体培地上で培養するのに適した微生物としては、例えば、セルラーゼ産生菌、キシラナーゼ産生菌、キチナーゼ産生菌、アミラーゼ産生菌、マンナーゼ産生菌、マンノシダーゼ産生菌、アガラゼ産生菌、プルナーゼ産生菌、グルカナーゼ産生菌、ペクチナーゼ産生菌、ガラクトシダーゼ産生菌、アルギナーゼ産生菌、シクロデキストリン合成酵素産生菌、プロテアーゼ産生菌、リパーゼ産生菌、カタラーゼ産生菌、ポリアミノキシダーゼ産生菌、RNase産生菌、DNase産生菌、DNAポリメラーゼ産生菌などが挙げられる。

#### 【0022】

また、本発明のセルロースゲルを用いた固体培地の特性を生かして、好熱菌、好冷菌、好アルカリ性菌、好酸性菌、好塩菌、好圧菌、有機溶媒耐性菌などの極限環境微生物を効率よく培養することができる。例えば、80℃を超える高温で生育する超好熱菌や、pHが2以下のような高酸性で生育する好酸性菌あるいはpHが12以上の高アルカリ性で生育する好アルカリ性菌のような極限環境条件での微生物の培養に有用に使用することができる。

## 【0023】

次に、本発明を実施例によって更に詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。なお、実施例中で「%」は特に異なる注記をしない限り質量基準である。

## 【0024】

以下の実施例において微生物の培養に用いた各培地は下記のようにして調製した。

## (A) LB培地 (pH7):

トリプトン10g、酵母エキス5g、塩化ナトリウム10gを1リットルの蒸留水に溶解し、これを水酸化ナトリウムにてpHを7に調整し、加熱滅菌して調製した。

## (B) LB培地 (pH2):

トリプトン10g、酵母エキス5g、塩化ナトリウム10gを1リットルの蒸留水に溶解し、これを塩酸にてpHを2に調整し、加熱滅菌して調製した。

## (C) LB培地 (pH12):

トリプトン10g、酵母エキス5g、塩化ナトリウム10gを1リットルの蒸留水に溶解し、これを水酸化ナトリウムにてpHを12に調整し、加熱滅菌して調製した。

## 【0025】

## (D) TSB培地:

TSB (trypticase soy broth) の30gを1リットルの蒸留水に溶解した後、加熱滅菌して調製した。

## (E) TSB/炭酸ナトリウム培地:

TSB (trypticase soy broth) の30gと、別途滅菌した炭酸ナトリウム5g (対蒸留水0.5%) を1リットルの蒸留水に溶解した後、加熱滅菌して調製した。

## (F) TSB培地 (pH5.6):

TSB (trypticase soy broth) の30gを1リットルの蒸留水に溶解し、加熱滅菌した後、塩酸にてpHを5.6に調整して調製した。

## 【0026】

## (G) YPD培地:

酵母エキス10g、バクトペプトン20g、グルコース20gを1リットルの蒸留水に溶解し、加熱滅菌して調製した。

## (H) HORIKOSHI-II培地:

可溶性でんぷん10g、ポリペプトン5g、酵母エキス5g、リン酸水素二カリウム1g、硫酸マグネシウム七水和物0.2gを0.8mLの蒸留水に溶解した後、水酸化ナトリウム水溶液でpH7.5に調整した。別途10%炭酸水素ナトリウム水溶液を0.2リットル調製した。これらを加熱滅菌した後、混合して調製した。

## (I) BA培地:

酵母エキス1g、硫酸アンモニウム0.2g、硫酸マグネシウム七水和物0.5g、塩化カルシウム二水和物0.25g、およびリン酸二水素カリウム0.6gを0.5リットルの蒸留水に溶解後、pHを硫酸で3に調整した。グルコース1gを0.5リットルの蒸留水に溶解した。これらを加熱滅菌した後、混合し1リットルとした。

## 【0027】

## (J) SULFOLOBUS培地:

酵母エキス1g、硫酸アンモニウム1.3g、リン酸二水素カリウム0.28g、硫酸マグネシウム七水和物0.25g、塩化カルシウム二水和物0.07g、塩化鉄(III)六水和物0.02g、塩化マンガン四水和物1.8mg、四ホウ酸ナトリウム4.5mg、硫酸亜鉛七水和物0.22mg、塩化銅(II)二水和物0.05mg、モリブデン酸ナトリウム0.03mg、酸化硫酸バナジウム(IV)二水和物0.03mg、塩化コバルト(II)六水和物0.01mgを1リットルの蒸留水に溶解した後、pHを硫酸でpH2に調整し、濾過滅菌して調製した。

## 【実施例1】

## 【0028】

## (i) セルロースゲルの調製

結晶性セルロース（フナセル、フナコシ製）を、チオシアン酸カルシウム四水和物（和光純薬製）の飽和水溶液（59%）に3%の濃度になるように加え、室温で1時間攪拌して、セルロース分散液を得た。セルロース分散液20mLをガラス製シャーレ（外径90mm、深さ17mm）に分注した後、これをオートクレーブ（トミー精工製、KS-243）内に設置して120℃で1分間加熱し、セルロースを加熱溶解した。このセルロース溶液を一晩室温で放冷し、固化させた。次いで、メタノール、続いて流水で固化したセルロースのチオシアン酸カルシウムを洗浄後、蒸留水5Lを含む水槽中で、軽く攪拌しながら洗浄を続けた。1日に2度の頻度で水を交換しながら、洗浄液の電気伝導度が $5\mu\text{S}/\text{cm}$ 以下になった時点で洗浄を終了し、セルロースゲルを得た。

## 【0029】

図1および図2に、このようにして得たセルロースゲルの走査型電子顕微鏡写真を示す。図1が10,000倍、図2が100,000倍の写真であり、これからこのセルロースゲルがセルロースを骨格部分とした網目構造の、大きな空隙を有する多孔質の構造体であることがわかった。

このセルロースゲルは、オートクレーブ内で120℃で、1.5時間の間加熱滅菌してもその形状に軟化や熔融等の変化は全く見られず、優れた熱安定性を有することがわかった。

## 【0030】

比較のために、寒天を培地固化成分として用いた固体培地で同様の加熱試験を行なったところ、オートクレーブで120℃、15分間の加熱滅菌によって固体培地が溶解した。

また、同様にジェランガムを培地固化成分として用いた固体培地では、オートクレーブで120℃、15分間の加熱滅菌によって溶解した。

## 【0031】

## (ii) セルロース固体培地の調製

上記の(i)で得られたセルロースゲルを加熱滅菌した後、2倍濃度のLB培地(pH7)の20mLを重ねし、軽く攪拌しながら4時間放置した後、過剰の培地を除去して、LB(pH7)セルロース培地を得た。同様にLB培地(pH7)の代わりに、LB培地(pH2)およびLB培地(pH12)を用いて、それぞれLB(pH2)セルロース培地、LB(pH12)セルロース培地を得た。

LB(pH7)セルロース培地、LB(pH2)セルロース培地、LB(pH12)セルロース培地をそれぞれ含むシャーレをビニールテープで密封し、それぞれを60℃、70℃、80℃に保ったインキュベーター中に放置した。放置時間の経過とともにセルロース固体培地の状態を目視観察した。その結果は、表1に示すように、これらの条件下では7日が経過しても、セルロース固体培地はすべての温度とpHの条件で軟化・溶解することなく安定にその状態と形状を保持しており、固体培養に使用可能であった。

## 【0032】

## 比較例1:

上記実施例1の(ii)と同様にして、培地固化成分としてセルロースゲルの代わりに寒天を用いて、LB(pH7)寒天培地、LB(pH2)寒天培地、LB(pH12)寒天培地を調製した。培地を含むシャーレをビニールテープで密封し、60℃、70℃、80℃に保ったインキュベーター中に放置した。放置時間の経過とともに寒天培地の状態を目視観察した。その結果、LB(pH7)寒天培地は70℃でpH2および12において、また80℃ではすべてのpHにおいて軟化・溶解し、固体培養には使用できる状態ではなかった。

## 【0033】

## 比較例2:

上記実施例1の(ii)と同様にして、培地固化成分としてセルロースゲルの代わりにジェランガムを用いて、LB(pH7)ジェランガム培地、LB(pH2)ジェランガム培地、LB(pH12)ジェランガム培地を調製した。培地を含むシャーレをビニールテープで密封し、60℃、70℃、80℃に保ったインキュベーター中に放置した。放置時間の経過とともに

にジェランガム培地の状態を目視観察した。その結果、LB (pH7) ジェランガム培地は70℃でpH12において、また80℃ではすべてのpHにおいて軟化・溶解し、固体培養には使用できる状態ではなかった。

【0034】

【表1】

表1：寒天培地、ジェランガム培地、セルロース培地の安定性の比較

培地固化成分	60℃			70℃			80℃		
	pH			pH			pH		
	2	7	12	2	7	12	2	7	12
寒天	○ <sup>1</sup>	○ <sup>1</sup>	○ <sup>1</sup>	× <sup>1</sup>	○ <sup>1</sup>	× <sup>1</sup>	× <sup>3</sup>	× <sup>3</sup>	× <sup>3</sup>
ジェランガム	○ <sup>1</sup>	○ <sup>1</sup>	○ <sup>1</sup>	○ <sup>2</sup>	○ <sup>2</sup>	× <sup>2</sup>	× <sup>4</sup>	× <sup>4</sup>	× <sup>4</sup>
セルロース	○ <sup>1</sup>	○ <sup>1</sup>	○ <sup>1</sup>	○ <sup>1</sup>	○ <sup>1</sup>	○ <sup>1</sup>	○ <sup>1</sup>	○ <sup>1</sup>	○ <sup>1</sup>

○：使用可能、×：使用不可

1；7日間放置、2；5日間放置、3；15時間放置、4；2日間放置

【実施例2】

【0035】

(iii)セルロース固体培地による大腸菌の培養

実施例1と同様にしてLB (pH7)セルロース培地を調製した。大腸菌W3110株 (*Escherichia coli* W3110) は、あらかじめLB培地中、37℃でA<sub>600</sub>が1～1.5になるまで前培養を行った。この培養液を菌体濃度が $1 \times 10^3$  cells/mLになるように0.9%生理食塩水で希釈し、その0.1mLをLB (pH7)セルロース培地上にスプレッダーを用いて植菌し、37℃に保ったインキュベーター中で、16～18時間培養した後、コロニー数をカウントした。比較の対照として、LB (pH7)寒天培地上でも培養を行い、LB (pH7)セルロース培地上でのコロニー数と比較した。その結果、大腸菌のコロニー数は、LB (pH7)セルロース培地、LB (pH7)寒天培地ともに100個前後となり、大腸菌は、LB (pH7)セルロース培地上でも、LB (pH7)寒天培地上と同等の生育を示した。

【実施例3】

【0036】

(iv)セルロース固体培地による枯草菌の培養

実施例1と同様にしてLB (pH7)セルロース培地を調製した。枯草菌168株 (*Bacillus subtilis* 168) は、あらかじめLB培地中、37℃でA<sub>600</sub>が1～1.5になるまで前培養を行った。この培養液を菌体濃度が $1 \times 10^4$  cells/mLになるように0.9%生理食塩水で希釈し、その0.1mLをLB (pH7)セルロース培地上にスプレッダーを用いて植菌し、37℃に保ったインキュベーター中で、16～18時間培養した後、コロニー数をカウントした。比較の対照として、LB (pH7)寒天培地上でも培養を行い、LB (pH7)セルロース培地上でのコロニー数と比較した。その結果、枯草菌のコロニー数は、LB (pH7)セルロース培地、LB (pH7)寒天培地ともに120～150個となり、枯草菌は、LB (pH7)セルロース培地上でも、LB (pH7)寒天培地上と同等の生育を示した。

【実施例4】

【0037】

## (v) セルロース固体培地による酵母菌の培養

LB (pH 7) 培地の代わりに YPD 培地を用い、実施例 1 と同様にして YPD セルロース培地を調製した。サッカロミセス セレビス YPH499 株 (*Saccharomyces cerevisiae* YPH499) は、あらかじめ YPD 液体培地中、25℃で  $A_{600}$  が 3 になるまで前培養を行った。この培養液を菌体濃度が  $1 \times 10^3$  cells/mL になるように 0.9% 生理食塩水で希釈し、その 0.1 mL を YPD セルロース培地上にスプレッダーを用いて植菌し、25℃に保ったインキュベーター中で、2 日間培養した後、コロニー数をカウントした。比較の対照として、YPD 寒天培地上でも培養を行い、YPD セルロース培地上でのコロニー数と比較した。酵母菌のコロニー数は、YPD セルロース培地上で 140 個前後、YPD 寒天培地では 130 個前後となり、本酵母は YPD セルロース培地上でも、YPD 寒天培地上と同等の生育を示した。

## 【実施例 5】

## 【0038】

## (vi) セルロース固体培地による好アルカリ性バチルス属細菌の培養

LB (pH7) 培地の代わりに HORIKOSHI-II 培地を用い、実施例 1 と同様にして HORIKOSHI-II セルロース培地を調製した。好アルカリ性バチルス ハロデュランス C-125 株 (*Bacillus halodurans* C-125) は、あらかじめ HORIKOSHI-II 寒天培地で前培養を行った。コロニーを数個集め、 $1 \times 10^3$  cells/mL になるように 10 mM 硫酸マグネシウム水溶液で希釈し、その 0.1 mL を HORIKOSHI-II セルロース培地上にスプレッダーを用いて植菌し、37℃に保ったインキュベーター中で、16~18 時間培養した後、コロニー数をカウントした。比較の対照として、HORIKOSHI-II 寒天培地上でも培養を行い、HORIKOSHI-II セルロース培地上でのコロニー数と比較した。HORIKOSHI-II セルロース培地でのコロニー数は 191 個であり、HORIKOSHI-II 寒天培地でのコロニー数は 186 個であり、*Bacillus halodurans* C-125 は、HORIKOSHI-II セルロース培地上でも、HORIKOSHI-II 寒天培地上と同等の生育を示した。

## 【0039】

また、LB (pH7) 培地の代わりに TSB/炭酸ナトリウム培地を用い、実施例 1 と同様にして TSB/炭酸ナトリウムセルロース培地を調製した。好アルカリ性バチルス アガラドハランス JAMB-602 株 (*Bacillus agaradhaerans* JAMB-602) は、あらかじめ TSB/炭酸ナトリウム培地中で、37℃で  $A_{600}$  が 1~1.5 になるまで前培養を行った。この培養液を、菌体濃度が  $1 \times 10^3$  cells/mL になるように 0.9% 生理食塩水で希釈し、その 0.1 mL を TSB/炭酸ナトリウムセルロース培地上にスプレッダーを用いて植菌し、37℃に保ったインキュベーター中で、16~18 時間培養した後、コロニー数をカウントした。比較の対照として、TSB/炭酸ナトリウム寒天培地上でも培養を行い、TSB/炭酸ナトリウムセルロース培地上での生育と比較した。*Bacillus agaradhaerans* JAMB-602 は、TSB/炭酸ナトリウムセルロース培地上でも、TSB/炭酸ナトリウム寒天培地上と同等の生育を示し、約 200 個のコロニーを形成した。

## 【実施例 6】

## 【0040】

## (vii) セルロース固体培地による担子菌の培養

LB (pH7) 培地の代わりに TSB (pH5.6) 培地を用い、実施例 1 と同様にして TSB (pH5.6) セルロース培地を調製した。プレート中央部に、寒天培地上で前培養したイルペックス ラクテウス NBRC5367 株 (*Irpex lacteus* NBRC5367) を植菌し、室温で 8 日間培養した。比較の対照として、TSB (pH5.6) 寒天培地上でも培養を行い、TSB (pH5.6) セルロース培地上での生育と比較した。*Irpex lacteus* NBRC5367 は、TSB (pH5.6) セルロース培地上でも、TSB (pH5.6) 寒天培地上と同等の生育を示した。

また、TSB (pH5.6) セルロース培地では、*Irpex lacteus* NBRC5367 が産生するセルラーゼによって、セルロースが分解し、溶斑 (ハロー) を形成した。セルロース培地がセルラーゼ産生菌のスクリーニングに利用可能であることがわかった。

## 【実施例 7】

## 【0041】

(viii) セルロース固体培地による好熱好酸性菌の培養

LB (pH 7) 培地の代わりに BA 培地を用い、実施例 1 と同様にして BA セルロース培地を調製した。好熱好酸性アリシクロバチルス アシドカルダリス JCM5260 株 (*Alicyclobacillus acidocaldarius* JCM5260) は、あらかじめ BA 培地中、70℃で A<sub>600</sub> が 0.5 になるまで前培養を行った。この培養液 0.1 mL を BA セルロース培地上にスプレッダーを用いて植菌し、70℃で 18~24 時間培養した。比較の対照として、BA 寒天培地、BA ジェランガム培地上でも培養を行い、BA セルロース培地上での生育と比較した。*Alicyclobacillus acidocaldarius* JCM5260 は、BA セルロース培地、BA ジェランガム培地上ではコロニーを形成したが、BA 寒天培地ではコロニー形成が見られなかった。

## 【0042】

また LB (pH 7) 培地の代わりに SULFOLOBUS 培地を用い、実施例 1 と同様にして SULFOLOBUS セルロース培地を調製した。好熱好酸性サルホロバス アシドカルダリス DSM639 株 (*Sulfolobus acidocaldarius* DSM639) は、あらかじめ SULFOLOBUS 培地中、70℃で A<sub>600</sub> が 0.8 になるまで前培養を行った。この培養液を 10<sup>3</sup> 倍に SULFOLOBUS 培地で希釈し、その 0.1 mL を SULFOLOBUS セルロース培地上にスプレッダーを用いて植菌し、70℃で 4 日間培養した。比較の対照として、SULFOLOBUS 寒天培地、SULFOLOBUS ジェランガム培地上でも培養を行い、SULFOLOBUS セルロース培地上での生育と比較した。*Sulfolobus acidocaldarius* DSM639 は、SULFOLOBUS セルロース培地、SULFOLOBUS ジェランガム培地上ではコロニーを形成したが、SULFOLOBUS 寒天培地ではコロニー形成が見られなかった。また 80℃でも 6 日間培養を行ったところ、SULFOLOBUS セルロース培地上で 5~6 個、SULFOLOBUS ジェランガム培地上で 1 個のコロニーを形成し、SULFOLOBUS セルロース培地上で、より良好な生育を示した。

## 【産業上の利用可能性】

## 【0043】

本発明のセルロースゲルを使用する固体培地は、従来の代表的な固体培地である寒天培地では困難であった高い温度や広い pH 範囲、あるいは種々の塩濃度でも、軟化したり溶解することなく、その性質と形状を安定して保持することができる。したがって、さまざまな微生物の固体培養が可能となり、有用な酵素や化学物質を産生する新規な微生物を単離したり、生産するために利用することができる。

## 【図面の簡単な説明】

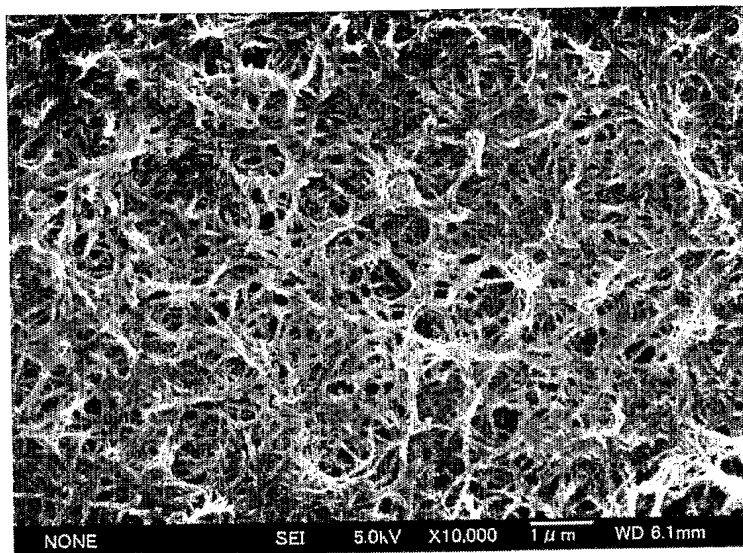
## 【0044】

【図 1】本発明の固体培地に使用するセルロースゲルの表面状態を示す倍率 10,000 倍の走査型電子顕微鏡写真である。

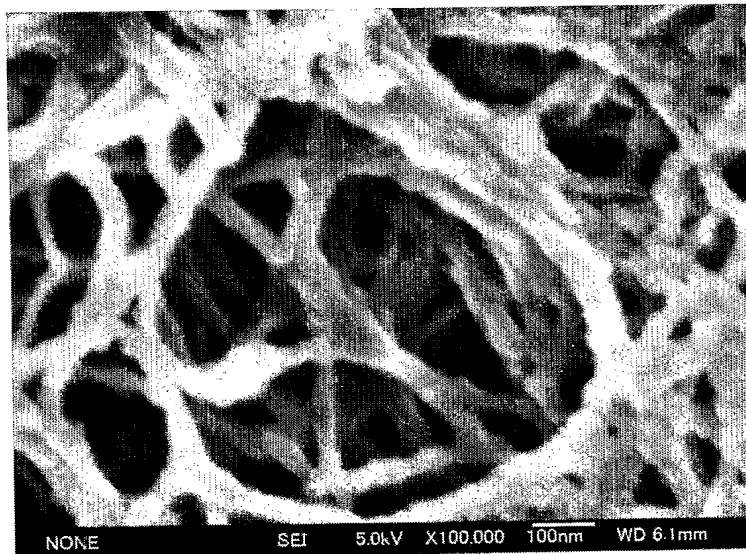
【図 2】本発明の固体培地に使用するセルロースゲルの表面状態を示す倍率 100,000 倍の走査型電子顕微鏡写真である。

【書類名】 図面

【図 1】



【図 2】



## 【書類名】要約書

## 【要約】

【課題】 温度、pH 或いは塩濃度などの条件によっては使用することができない寒天培地などの従来の固体培地の問題点を解決し、より広い範囲の培養条件下で 사용할ことができる固体培地とその製造方法を提供すること。

【解決手段】 本発明は、培地固化成分として、セルロースゲル、特にセルロースを骨格部分とし、セルロース濃度が 0.01% 以上、空隙率が 50% 以上である多孔質のセルロースゲル構造体であるセルロースゲルを含む固体培地とその製造方法である。本発明の固体培地は、セルロースを溶媒、特にチオシアン酸塩水溶液に分散して、攪拌および/または加熱により溶解し、次いで冷却および/または溶媒除去によりゲル化させ後、得られたセルロースゲルに栄養素を浸透させることによって製造することができる。

【選択図】 図 1



## 認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 4 - 0 5 7 6 1 8
受付番号	5 0 4 0 0 3 3 9 8 7 6
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0 0 9 4
作成日	平成 1 6 年 3 月 8 日

## &lt;認定情報・付加情報&gt;

## 【特許出願人】

【識別番号】	000124982
【住所又は居所】	神奈川県横須賀市夏島町 2 番地 1 5
【氏名又は名称】	海洋科学技術センター

## 【代理人】 申請人

【識別番号】	100077975
【住所又は居所】	東京都千代田区神田和泉町 1 番地 1 3 の 1 水戸 部ビル 4 階
【氏名又は名称】	望月 孜郎

## 【代理人】

【識別番号】	100086324
【住所又は居所】	東京都千代田区神田和泉町 1 番地 1 3 の 1 水戸 部ビル 4 階
【氏名又は名称】	小野 信夫

【書類名】 出願人名義変更届（一般承継）  
【提出日】 平成16年12月 1日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【事件の表示】  
【出願番号】 特願2004- 57618  
【承継人】  
【識別番号】 504194878  
【氏名又は名称】 独立行政法人海洋研究開発機構  
【承継人代理人】  
【識別番号】 100077975  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 望月 孜郎  
【承継人代理人】  
【識別番号】 100086324  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 小野 信夫  
【提出物件の目録】  
【物件名】 承継人であることを証する書面 1  
【援用の表示】 特願 2 0 0 3 - 1 9 2 1 9 9 の出願人名義変更届（一般承継）に  
添付のものを援用する。  
【物件名】 登記簿謄本 1  
【援用の表示】 特願 2 0 0 3 - 1 9 2 1 9 9 の出願人名義変更届（一般承継）に  
添付のものを援用する。  
【包括委任状番号】 0408264  
【包括委任状番号】 0408265

## 認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2004-057618
受付番号	50402050571
書類名	出願人名義変更届 (一般承継)
担当官	鈴木 夏生 6890
作成日	平成 16 年 12 月 15 日

## &lt;認定情報・付加情報&gt;

## 【承継人】

【識別番号】	504194878
【住所又は居所】	神奈川県横須賀市夏島町 2 番地 15
【氏名又は名称】	独立行政法人海洋研究開発機構

## 【承継人代理人】

申請人	
【識別番号】	100077975
【住所又は居所】	東京都千代田区神田和泉町 1 番地 13 の 1 水戸 部ビル 4 階
【氏名又は名称】	望月 孜郎

## 【承継人代理人】

【識別番号】	100086324
【住所又は居所】	東京都千代田区神田和泉町 1 番地 13 の 1 水戸 部ビル 4 階
【氏名又は名称】	小野 信夫

特願 2 0 0 4 - 0 5 7 6 1 8

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [ 0 0 0 1 2 4 9 8 2 ]

1. 変更年月日 2 0 0 3 年 4 月 1 7 日

[変更理由]

住所変更

住 所

神奈川県横須賀市夏島町 2 番地 1 5

氏 名

海洋科学技術センター

特願 2 0 0 4 - 0 5 7 6 1 8

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [ 5 0 4 1 9 4 8 7 8 ]

1. 変更年月日	2 0 0 4 年 5 月 1 9 日
[変更理由]	新規登録
住 所	神奈川県横須賀市夏島町 2 番地 1 5
氏 名	独立行政法人海洋研究開発機構